



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Chemii



dr hab. Łukasz Tymecki, prof. ucz.

Pracownia Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej
Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej
Laboratorium Mikrosystemów Analitycznych
Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego

ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa

l.tymecki@uw.edu.pl

+48 (22) 55 26 262

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Anny Magdaleny Szymczyk-Drozd

pt.: „Projektowanie narzędzi (bio)analitycznych wykorzystujących kwasy nukleinowe – od oddziaływań molekularnych do zastosowań praktycznych”

Rozprawa doktorska mgr inż. Anny Magdaleny Szymczyk-Drozd, zrealizowana na Politechnice Warszawskiej pod kierunkiem dr. hab. inż. Roberta Ziółkowskiego, prof. PW, stanowi obszerne studium w zakresie projektowania narzędzi (bio)analitycznych opartych na kwasach nukleinowych. Praca ta ma istotne znaczenie dla rozwoju elektrochemicznych biosensorów DNA, oferując nowatorskie spojrzenie na mechanizmy oddziaływań molekularnych oraz ich wpływ na parametry analityczne sensorów. Tematyka rozprawy jest wysoce aktualna i odpowiada na rosnące zapotrzebowanie na szybkie, ekonomiczne i niezawodne metody detekcji zarówno biomarkerów genetycznych, jak i zanieczyszczeń środowiskowych.

Rozprawa cechuje się spójnością tematyczną i obejmuje pięć artykułów naukowych (P1–P5), które szczegółowo opisują zrealizowane zadania badawcze. Głównym celem pracy było pogłębienie wiedzy na temat wzajemnych interakcji pomiędzy składnikami próbek i roztworów pomiarowych a komponentami warstw receptorowych elektrochemicznych biosensorów DNA, a także ocena ich wpływu na kluczowe parametry działania sensorów, takie jak granica wykrywalności, selektywność oraz stabilność sygnału prądowego.

Rozprawa ma układ monografii z cyklem publikacji i liczy łącznie 214 stron. Zawiera 14 rysunków oraz 2 tabele. Obejmuje streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, wstęp, przegląd literatury, część eksperymentalną, omówienie wyników oraz wnioski końcowe. Bibliografia obejmuje 136 pozycji literaturowych. Publikacje naukowe (P1–P5), stanowiące podstawę rozprawy, poprzedzają oświadczenia współautorów od strony 89, natomiast same publikacje rozpoczynają się od strony 107.



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Chemii



Rozprawa doktorska opiera się na cyklu pięciu spójnych tematycznie publikacji naukowych, których łączny Impact Factor (IF) wynosi 30,2, a średnia wartość IF to 6,04. Sumaryczna liczba punktów MEiN przypisana tym publikacjom wynosi 760 (średnio 152). Zgodnie z oświadczeniami współautorów, mgr inż. Szymczyk-Drozd jest wiodącą autorką (i pierwszą na liście), jednak w żadnej z publikacji nie figuruje jako autorka korespondencyjna – co odnotowuję z recenzenckiego obowiązku, a nie jako zarzut. Doktorantka jest również współautorką zgłoszenia patentowego dotyczącego sekwencji aptamerowej DNA do detekcji jonów metali co dowodzi atrakcyjności osiągniętych wyników.

W ramach prowadzonych badań autorka skupiła się na następujących zagadnieniach:

- optymalizacji składu warstw receptorowych poprzez badanie roli związków pełniących funkcję wypełniaczy w monowarstwach mieszanych,
- porównaniu różnych typów podłoży elektrodowych, w tym klasycznych elektrod dyskowych, układów elektrod sitodrukowanych oraz tych wykonanych w technologii osadzania fizycznego z fazy gazowej (PVD),
- badaniu wpływu środowiska pomiarowego oraz sekwencji sond DNA/aptamerów na detekcję jonów rtęci(II) (Hg^{2+}) i selenianów(VI) (SeO_4^{2-}),
- opracowaniu funkcjonalizowanych nanocząstek magnetycznych przeznaczonych do wydzielania kwasów nukleinowych z próbek.

W pracach zastosowano szerokie spektrum technik analitycznych, w tym: woltamperometrię cykliczną i fali prostokątnej, elektrochemiczną spektroskopię impedancyjną, pomiary z użyciem mikrowagi kwarcowej z detekcją zmian dyssypacji energii, spektrometrię mas (ICP-MS/MS), spektrofotometrię UV-Vis, termogravimetrię oraz techniki charakteryzacji materiałów, takie jak mikroskopia elektronowa (SEM/STEM) i spektroskopia w podczerwieni (FT-IR).

Pogłębiona Analiza Publikacji (P1-P5) z uwzględnieniem punktów do dyskusji:

Publikacja P1:

„Further insight into the possible influence of electrode blocking agents on the stem-loop based electrochemical DNA sensor parameters” (DOI: 10.1016/j.snb.2021.131086).

Kluczowe osiągnięcia:

Autorka porównała różne związki stosowane do uszczelniania warstwy SAM, wykazując, że dietylditiokarbaminian sodu (DEDTC) stanowi obiecującą alternatywę dla powszechnie używanego 6-merkapto-1-heksanolu (MCH). DEDTC istotnie ograniczał interferencje ze strony białek, zapewniał



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Chemii



wyższe natężenie sygnału prądowego oraz umożliwiał skuteczną detekcję materiału genetycznego *Corynebacterium diphtheriae*.

Uwagi do publikacji P1:

P1.Q1

Zaobserwowano, że w przypadku związków aromatycznych pełniących funkcję wypełniaczy, takich jak BDT i 2-PhET, sygnał SWV wykazywał istotną zmienność w czasie, co utrudniało uzyskanie stabilnej odpowiedzi sensora – prawdopodobnie na skutek oddziaływań π - π . Mimo że autorzy wyraźnie to podkreślają, sugeruje to, że optymalne warunki immobilizacji tych związków mogą wymagać dalszych badań. Warto rozważyć zastosowanie 1,4-benzenoditiolu zamiast 1,3-benzenoditiolu – jego geometria ogranicza możliwość adsorpcji na powierzchni złota przez obie grupy -SH jednocześnie, a jednocześnie sprzyja formowaniu uporządkowanej warstwy dzięki oddziaływaniom π - π pomiędzy pierścieniami aromatycznymi, co poprawia jakość upakowania oraz szybkość przeniesienia elektronu. Zastosowanie merkaptoetanolu wydaje się natomiast nieuzasadnione – długość jego cząsteczek nie pozwala na utworzenie dobrze zorganizowanej warstwy, a zastosowane sondy DNA są znacznie dłuższe, co eliminuje potrzebę użycia bardzo krótkiego wypełniacza. Czy zatem negatywny wynik eksperymentu z tym związkiem nie był do przewidzenia?

P1.Q2

Czas immobilizacji sond DNA wynoszący 30 sekund oraz związków wypełniających – 24/48 godzin – nie wydaje się w pełni zoptymalizowany pod kątem uzyskania uporządkowanej warstwy SAM. Literatura wskazuje, że pełne uformowanie warstwy SAM, zwłaszcza dla dużych biomolekuł, wymaga dłuższego czasu. Początkowy etap fizysorpcji tioli trwa milisekundy, natomiast tworzenie wiązań Au-S – od kilku minut wzwyż. Biorąc pod uwagę dużą masę sond DNA, ich dyfuzja do powierzchni elektrody przebiega znacznie wolniej niż dla prostych tioli. Dodatkowo, różnica rzędu trzech rzędów wielkości między stężeniem sond DNA a typowo stosowanymi stężeniami tioli (milimolowymi) również może mieć wpływ na kinetykę adsorpcji. Czy prowadzono badania z dłuższym czasem adsorpcji sond DNA? Czy oceniano pojemność elektryczną elektrod po immobilizacji sond, a przed adsorpcją cząsteczek wypełniających (można to oszacować z pomiarów impedancyjnych)? Czy określono stężenie powierzchniowe sond metodą Tarlova?

P1.Q3

Proszę o uzasadnienie zastosowania zaproponowanego obwodu zastępczego dla czystej elektrody. Jakiego rzędu oporu przeniesienia ładunku można się spodziewać na zupełnie czystej elektrodzie złotej? Dlaczego w przypadku elektrody pokrytej DEDTC opór przeniesienia ładunku jest niższy niż dla czystej elektrody (Fig. 8)? Zjawisko to wydaje się nietypowe – czy można je powiązać z budową warstwy DEDTC lub jej wpływem na strukturę podwójnej warstwy elektrycznej?



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Chemii



Publikacja P2:

„Practical Aspects of SAM-Based Electrochemical DNA Biosensors on Miniaturized Planar Gold Transducers: A Case Study with SARS-CoV-2” (10.1016/j.measurement.2024.114089).

Kluczowe osiągnięcia:

W pracy wykazano, że elektrody złote wytwarzane metodą fizycznego osadzania z fazy gazowej (PVD, *Physical Vapor Deposition*) stanowią wyraźnie lepszą alternatywę dla komercyjnych elektrod sitodrukowanych w konstrukcji miniaturowych biosensorów DNA. Elektrody PVD charakteryzowały się bardziej jednorodną morfologią i niższą chropowatością powierzchni, co przekładało się na wyższą stabilność oraz lepszą powtarzalność sygnału elektrochemicznego. W pracy zaprojektowano i wykorzystano sondy DNA typu „spinka” do detekcji markerów genetycznych wirusa SARS-CoV-2. Dodatek DMSO (20% v/v) do buforu pomiarowego poprawiał wydajność hybrydyzacji w obecności białek, umożliwiając skuteczne rozróżnienie próbek pozytywnych i negatywnych.

Uwagi do publikacji P2:

P2.Q1

W pracy postawiono hipotezę, że wyższe odpowiedzi sensora uzyskiwane dla elektrod PVD, w porównaniu z klasycznymi elektrodami dyskowymi, mogą wynikać z niższej gęstości powierzchniowej sond DNA lub mniejszej powierzchni czynnej elektrody (jak w przypadku elektrod BVT). Hipoteza ta została jednak oparta na pośrednich obserwacjach. W celu jednoznacznej interpretacji wyników konieczne byłoby bezpośrednie określenie gęstości powierzchniowej sond DNA dla obu typów elektrod. Niemniej jednak, postawiona teza podkreśla znaczenie precyzyjnej kontroli jakości warstwy receptorowej. Proszę o odniesienie się do tej kwestii.

P2.Q2

Proszę wyjaśnić, dlaczego procedura elektrochemicznego czyszczenia elektrod obejmowała zakres potencjałów od 0,5 V do 1,7 V (w roztworach NaOH i H₂SO₄), podczas gdy w pracy P1 zastosowano zakres od -0,5 V, co umożliwiało zakończenie procesu po stronie redukcji. Czy zmiana zakresu potencjałów miała charakter świadomy i wynikała z odmiennych właściwości powierzchni elektrod PVD?

P2.Q3

W jaki sposób zapewniono trwałe związanie warstwy złota napyłonego metodą PVD z podłożem? Czy zastosowano dodatkowe warstwy adhezyjne lub inne zabiegi technologiczne? Czy wykonano pomiary oporu elektrycznego między elektrodą złotą a jej wyprowadzeniem oraz czy wyprowadzenie również zostało wykonane ze złota?



UNIwersYTET
WARSAWSKI

Wydział Chemii



Publikacja P3:

„Identification of medium- and mechanism-related pitfalls towards improved performance and applicability of electrochemical mercury(II) aptasensors” (10.1007/s00604-024-06272-w)

Kluczowe osiągnięcia:

Praca wnosi istotny wkład w zrozumienie mechanizmu detekcji jonów rtęci(II) z wykorzystaniem aptamerów poliT. Wykazano, że obserwowany spadek sygnału prądowego typu „signal-off” wynika z tworzenia się międzycząsteczkowych mostków T–Hg²⁺–T, które usztywniają warstwę receptorową, a nie – jak wcześniej sugerowano – z reorganizacji wewnątrz jednej nici aptameru. Zoptymalizowano skład buforu pomiarowego (MOPS + fosforany), co znacząco poprawiło stabilność sygnału oraz czułość aptasensora, umożliwiając detekcję Hg²⁺ na poziomie subpikomolarnym (LOD = 0,001 nM), znacznie poniżej limitów wyznaczonych przez WHO. Opracowano również skuteczną procedurę regeneracji oraz długoterminowego przechowywania sensora w roztworze EDTA. Miniaturyzacja czujnika z użyciem przetworników PVD również przyniosła pozytywne rezultaty.

Uwagi do publikacji P3:

P3.Q1

W przypadku łańcuchów poliT zastosowano 30-minutowy czas immobilizacji oraz zwiększone stężenie sond w roztworze do samoorganizacji. Czy na podstawie uzyskanych danych Autorka może określić, jaki sposób oraz czas immobilizacji cząsteczek modyfikowanego DNA okazuje się najbardziej wydajny?

P3.Q2

Autorzy, analizując mechanizm detekcji Hg²⁺ oraz odległość pomiędzy markerem redoks a powierzchnią elektrody dla sondy poliT (10 nt), odwołują się do pracy Chidseya (*J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 3559–3568), dotyczącej orientacji alkanotiooli, gdzie przyjęty kąt względem normalnej wynosi 20–30°. Czy – zdaniem Autorki – odniesienie tych założeń do sond DNA modyfikowanych grupą C6-SH jest uzasadnione i dlaczego? Należy przy tym zauważyć, że na powierzchni elektrody znajduje się dodatkowa warstwa blokująca z MCH, co może utrudniać transport elektronów z cząsteczki redoks do powierzchni elektrody.

Publikacja P4:

„Aptamer and Electrochemical Aptasensor towards Selenate Ions (SeO₄²⁻)” 10.3390/ijms25126660.

Kluczowe osiągnięcia:

Praca przedstawia pierwsze w literaturze zastosowanie nowo wyselekcjonowanego aptameru do elektrochemicznej detekcji anionów selenianowych(VI) (SeO₄²⁻). Opracowany aptasensor,



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Chemii



działający w optymalnym pH = 4,0, osiągnął granicę detekcji na poziomie 1 nM oraz wykazywał wysoką selektywność. Mechanizm typu „signal-on” został zinterpretowany jako rezultat zwiększenia dostępnej przestrzeni w pobliżu powierzchni elektrody dla cząsteczki markera redoks (błękitu metylenowego) po związaniu selenianów. Wykazano skuteczność regeneracji warstwy receptorowej z użyciem węgla sodu oraz zachowanie stabilności sensora po tygodniu przechowywania. Interpretacja mechanizmu wzrostu sygnału opiera się na wnioskowaniu dotyczącym zmiany konformacyjnej aptameru, co znajduje uzasadnienie w wynikach eksperymentalnych oraz cytowanej literaturze. Niemniej jednak, bezpośrednie dowody strukturalne tej zmiany (np. z użyciem spektroskopii lub mikroskopii sił atomowych) nie zostały przedstawione – co autorzy słusznie wskazują jako kierunek dalszych badań.

Uwaga do publikacji P4:

P4.Q1

Zasadne wydaje się pytanie o procedurę modyfikacji powierzchni elektrody: podczas gdy dla tiolowanych aptamerów zastosowano 30 minut na samoorganizację warstwy (self-assembly), etap uszczelniania z wykorzystaniem merkaptoheksanolu prowadzono jedynie przez 2 godziny. Z czego wynika różnica w czasie tych procesów? Czy procedury zostały zoptymalizowane niezależnie, czy też czas uszczelniania mógłby zostać wydłużony celem poprawy jakości warstwy receptorowej?

Publikacja P5

„Comparative evaluation of different surface coatings of Fe₃O₄ based magnetic nano sorbent for applications in the nucleic acids extraction” DOI: 10.3390/ijms2506660.

W pracy przeprowadzono kompleksową, ilościową ocenę skuteczności różnych metod modyfikacji powierzchni nanocząstek magnetycznych Fe₃O₄ (m.in. pokrycie polietylenoiminą – PEI, złotem, krzemionką oraz utlenionym grafenem) w kontekście wydajności ekstrakcji kwasów nukleinowych. Wykazano, że nanocząstki funkcjonalizowane PEI wykazują najwyższą zdolność adsorpcji DNA, co przypisano silnym oddziaływaniom elektrostatycznym. Podkreślono również nowatorski aspekt zastosowanej metody: użycie PEI jako stabilizatora wprowadzanego in situ podczas syntezy współstrąceniowej magnetycznych nanocząstek (MNPs). Choć deklaracja o „pierwszym zastosowaniu” tej techniki stanowi wyraźną tezę nowości metodologicznej, jej weryfikacja wykracza poza zakres zaprezentowanych danych i wymagałaby szeroko zakrojonego przeglądu literatury, znacznie wykraczającego poza cytowane źródła. Podobnie jak w publikacjach P3 i P4, wnioski dotyczące mechanizmów interakcji DNA–MNP opierają się głównie na danych makroskopowych (potencjał zeta, analiza morfologii), przy braku bezpośrednich dowodów strukturalnych na poziomie molekularnym. Taka sytuacja jest jednak powszechna w tego typu badaniach i wskazuje na potencjalny kierunek przyszłych, bardziej pogłębionych analiz.



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Chemii



Uwaga do publikacji P5:

P5.Q1

Na stronie 42 pracy znalazło się stwierdzenie dotyczące buforu octanowego o pH=8.

Czy to jeszcze jest bufor??

PODSUMOWANIE

Rozprawa doktorska mgr inż. Anny Szymczyk-Drozd stanowi bardzo wartościowy wkład w dziedzinę biosensorów DNA. Doceniam przejrzystość w przedstawianiu wyników oraz otwartość wskazywania na napotkane wyzwania i obszary wymagające dalszych badań. Do kluczowych osiągnięć badawczych, przedstawionych w pięciu publikacjach z listy filadelfijskiej, zaliczam:

1. Zaproponowanie i udowodnienie użyteczności DEDTC jako wypełniacza warstw SAM, minimalizującego niespecyficzną adsorpcję białek.
2. Wykazanie przewagi przetworników PVD nad sitodrukowanymi w konstrukcji miniaturowych biosensorów DNA, zapewniających wysoką stabilność i powtarzalność sygnału.
3. Wyjaśnienie mechanizmu działania aptasensora Hg^{2+} opartego na usztywnieniu warstwy receptorowej przez międzycząsteczkowe mostki $\text{T-Hg}^{2+}\text{-T}$, a także opracowanie aptasensora o niezwykle niskiej granicy wykrywalności (0,001 nM) oraz możliwości regeneracji i długotrwałego przechowywania.
4. Opracowanie pierwszego aptasensora do detekcji anionów selenianowych (SeO_4^{2-}), wykorzystującego nowo wyselekcjonowany aptamer i oferującego niską granicę detekcji (1 nM).
5. Przeprowadzenie szczegółowej, porównawczej analizy modyfikacji powierzchni nanocząstek magnetycznych do ekstrakcji DNA, ze wskazaniem na najwyższą wydajność nanocząstek pokrytych PEI. Transparentne rozwiązanie problemu interferencji EDTA z pomiarami UV-Vis w P5 dodatkowo wzmacnia wiarygodność pracy.

Wskazując niedoskonałości pracy, należy zauważyć, że:

- Brak jest bezpośrednich dowodów strukturalnych na postulowane mechanizmy molekularne [P3, P4, P5]: W wielu przypadkach zmiany konformacyjne DNA lub szczegółowe sposoby interakcji z powierzchnią (np. orientacja DNA) są wnioskowane na podstawie sygnałów elektrochemicznych lub właściwości powierzchniowych. Przyszłe badania z wykorzystaniem technik biostrukturalnych mogłyby dostarczyć bardziej definitywnych dowodów.
- Optymalizacja czasu immobilizacji SAM [P1, P3, P4] wymaga dopracowania: Choć Autorka stosowała ustalone procedury i uzyskiwała dobre wyniki, dla niektórych systemów pełna kinetyka tworzenia uporządkowanych monowarstw może wymagać dłuższego czasu.



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Chemii



W P1 i P3 (dla T18) zastosowano 30 minut, podczas gdy w P1 dla DEDTC inkubacja trwała 48 godzin. W P3 stabilność sensora po tygodniowym przechowywaniu w EDTA była znacząco lepsza, co sugeruje, że dalsza reorganizacja warstwy mogła mieć miejsce i korzystnie wpłynęła na jej właściwości.

Praca doktorska poszerza wiedzę w zakresie projektowania warstw receptorowych, wpływu środowiska pomiarowego oraz zastosowania nanomateriałów, dostarczając cennych wskazówek dla dalszych badań. Perspektywy kontynuacji tych badań – w szczególności integracja z układami mikroprzepływowymi oraz rozwój sensorów wielopolowych – wskazują na wysoki potencjał aplikacyjny opracowanych rozwiązań.

Zważywszy, że tytuł rozprawy zawiera sformułowanie „od oddziaływań molekularnych do zastosowań praktycznych”, warto zauważyć, że odniesienie do zastosowań ma w tej pracy raczej charakter zapowiadający niż odzwierciedlający pełen zakres przeprowadzonych badań. Choć przedstawione publikacje wnoszą istotny wkład w rozwój (bio)analitycznych narzędzi opartych na kwasach nukleinowych i oferują ciekawe rozwiązania konstrukcyjne oraz funkcjonalne, to ich weryfikacja odbywa się w większości przypadków w warunkach modelowych. Jedynie jedna z prac (P3, dotycząca detekcji jonów Hg^{2+}) zawiera elementy walidacji z wykorzystaniem rzeczywistych próbek. W tym kontekście tytuł rozprawy należy traktować jako stylistyczną antycypację kierunku rozwoju badań, a nie ściśle odzwierciedlenie ich obecnego stadium wdrożeniowego. Uwagi te – zarówno pozytywne, jak i te wskazujące na obszary dalszego doskonalenia – nie podważają wysokiej wartości naukowej rozprawy ani jakości przeprowadzonych eksperymentów. Wręcz przeciwnie – wskazują na konsekwentnie realizowaną strategię badawczą oraz potencjał kontynuacji prac w kierunku aplikacyjnym, w tym walidacji w warunkach rzeczywistych. Mając na uwadze powyższe, stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Magdaleny Szymczyk-Drozd spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668, z późn. zm.). Praca przedstawia oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, cechuje się wysokim poziomem rzetelności badawczej oraz przejrzystą prezentacją uzyskanych wyników.

Na podstawie przeprowadzonej analizy wnoszę o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, w uznaniu dla recenzowanej pracy przedkładam wniosek o wyróżnienie dysertacji.